

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10802

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌におけるPI3K経路上の変異解析とクリニカルシーケンスへの応用

研究課題名(英文) Mutational analysis on PI3K pathway in head and neck squamous cell carcinoma and its application to clinical sequence

研究代表者

朝蔭 孝宏 (ASAKAGE, Takahiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50361481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌初回治療例108例を対象とした。内訳は口腔癌31例、中咽頭癌22例、下咽頭癌33例、喉頭癌7例、鼻副鼻腔癌15例であった。これらの年齢は38歳～96歳、男性89例、女性19例であった。Stage I/II/III/IVがそれぞれ25例/20例/13例/45例であった。中咽頭癌に対してはHPV感染のスローゲートマーカーであるp16免疫染色を施行した。中咽頭癌22例中p16陽性は8例、p16陰性は5例、不明は9例であった。DNAは100例分抽出した。研究代表者の施設異動、実務担当者の留学などが重なり、研究の遂行に遅れが生じた。現在、遺伝子解析を実施中である。

研究成果の概要(英文)：Newly diagnosed 108 patients with head and neck squamous cell carcinoma were included. Oral/oropharyngeal/hypopharyngeal/laryngeal/sinonasal cancer were included 31/22/33/7/15 patients respectively. These age ranges from 38 to 96 years old, 89 males and 19 females. Stage I / II / III / IV were 25 cases / 20 cases / 13 cases / 45 cases respectively. For oropharyngeal cancer, p16 immunostaining, which is a slow-gate marker for HPV infection, was performed. Of 22 patients with oropharyngeal cancer, p16 positive was 8 cases, p16 negative 5 cases, unknown was 9 cases. 100 DNA samples were extracted. The facility change of the research representative and the study abroad of the person in charge of practice overlapped, causing delay in the execution of the research. Currently, gene analysis is in progress.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 扁平上皮癌 免疫染色 遺伝子解析 p16

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌の罹患数は全世界で年間 50 万人以上 (全癌中 6 位) に達し、集学的治療にもかかわらず 5 年生存率が 50% 程度の予後不良な疾患である。このような頭頸部癌治療に革新をもたらすためには、ゲノム異常を初めとする発癌の分子機構を解明し、現実の治療標的となり得るバイオマーカーを同定することが不可欠である。

現在までに証明されている頭頸部扁平上皮癌の発癌機構は、アルコール・タバコの嗜好により蓄積する TP53 などの癌抑制遺伝子変異、ならびに高リスク型 HPV 感染の二つである。近年登場した分子標的薬である抗 EGFR 阻害剤 Cetuximab は、これらの発癌機構を標的とするものではなく、治療効果を予測するバイオマーカーも存在しないことが最大の欠点であり、残念ながら頭頸部扁平上皮癌治療におけるインパクトは限定的と言わざるを得ない。

(2) 近年、頭頸部扁平上皮癌の約 30% が PI3K 経路上の遺伝子変異を持つことが報告された (Cancer Discov 2013)。PI3K 経路異常は、TP53 変異あるいは HPV 感染とは関連性がない固有の発癌分子機構を持つと考えられているが、詳細は未解明である。PI3K 経路の独立性・特殊性は、遺伝子変異プロファイルからも示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、頭頸部扁平上皮癌において TP53 変異ならびにヒトパピローウイルス (HPV) 感染に次ぐ第三の発癌因子として PI3K 経路異常がもたらす臨床像を解明し、患者層別化のための新たなバイオマーカーとして確立することを目的とする。

3. 研究の方法

PI3K 経路上の変異解析から TP53 変異および HPV 感染情報を統合した生存解析、さらに PI3K 経路異常が発癌に与える分子機構の解明、最終的に臨床応用へと展開するために、本研究では以下の研究項目を予定している。

(1) 次世代シーケンサーとマイクロアレイを用いて、臨床試料 (約 200 例) を対象に網羅的解析を実施する。具体的には癌関連遺伝子の変異解析を次世代シーケンサーを用いて網羅的変異解析を行う。特異な臨床経過の症例に対しては全エクソン解析を実施する。また、マイクロアレイを用いた発現解析を行う。

(2) 同試料における HPV 感染状況を免疫染色、in situ hybridization、real-time PCR などの手法により探索する。

(3) 特に PI3K 経路の制御異常に注目し、発癌への寄与を分子生物学的に検討する。レ

ポーター系による解析、細胞表現型解析、腫瘍移植マウスによる解析を行う。

(4) 上記により得られた情報と臨床情報データベースを統合し、生存解析を行う。年齢、性別、TNM 分類、分化度、組織亜型、脈管侵襲などの一般的な臨床病理組織学的因子、術後経過、再発の有無、治療感受性、副作用発症の有無などとの関連を解析する。特に同時性重複癌あるいは異時性重複癌との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) 2015 年～2018 年の 3 年間に当院の疾患バイオリソースセンターのバイオバンクに 176 例の検体を集積・登録した。176 例中頭頸部悪性腫瘍は 134 例で、そのうち扁平上皮癌症例は 125 例であった。さらにそこから再発例を除いた初回治療例 108 例を対象とした。内訳は口腔癌 31 例、中咽頭癌 22 例、下咽頭癌 33 例、喉頭癌 7 例、鼻副鼻腔癌 15 例であった。これらの年齢は 38 歳～96 歳、中央値 70 歳、男性 89 例、女性 19 例であった。T 分類は T1/2/3/4 がそれぞれ 26 例/28 例/17 例/32 例、N 分類は N0/1/2/3 がそれぞれ 65 例/10 例/27 例/1 例であった (表 1)。Stage は Stage I/II/III/IV がそれぞれ 25 例/20 例/13 例/45 例で進行癌が多かった。組織学的分化度は高分化 35 例、中分化 30 例、低分化 21 例、不明 22 例であった。生活習慣では喫煙者は 64 例 (Brinkman index: 200～2580)、非喫煙者が 23 例、不明が 21 例であった。飲酒者が 63 例 (Sake index: 24～600)、非飲酒者が 16 例、不明が 29 例であった。飲酒喫煙者が 8 割程度を占めた。

表 1、対象症例の TN 分類

	N0	N1	N2	N3
T1	25	1	0	0
T2	20	3	4	1
T3	7	2	8	0
T4	13	4	15	0

(2) 中咽頭癌に対しては HPV 感染のスクリーンゲートマーカーである p16 免疫染色を施行した。中咽頭癌 22 例中 p16 陽性は 8 例、p16 陰性は 5 例、不明は 9 例であった (図 1)。

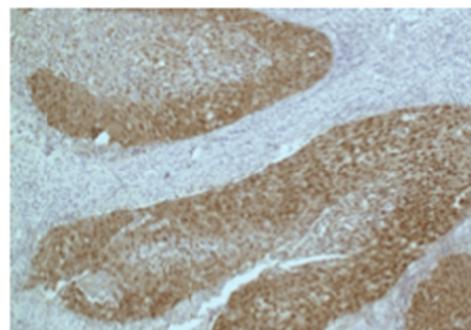


図 1、P16 免疫染色

(3) 重複癌を 38 例(35%)に認めた。食道癌が 20 例と最も多かった。これら重複癌症例では喫煙者は 27 例(71%)、飲酒者も同じく 27 例(71%)で、非重複癌患者の 52%に比較して喫煙者・飲酒者の割合が高かった。

(4) 対象症例に対して手術が 91 例、放射線療法が 16 例、対症療法が 1 例施行された。2018 年 3 月までに再発を来した症例は 22 例あった。最終確認時では健存が 88 例、担癌生存が 14 例、死亡が 6 例であった。

(5) 手術例では摘出標本および術中採血を、その他の例では治療前生検および採血をサンプルとして集積した。結果的に血清は 101 例、病理検体は 53 例、DNA は 100 例分抽出した。本来であれば研究期間中に次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析までを終了する予定であったが、研究期間中に研究代表者および連携研究者一名の施設異動、研究分担者および連携研究者一名の留学が重なり、新たに研究体制を構築しサンプルの集積を一から始める必要が生じてしまった。また、研究代表者の大病による余儀なく長期入院が必要になるなどのトラブルがあり、研究の遂行に大幅な遅れが生じてしまった。現在、大学設置の次世代シーケンサー Ion Proton を用いて、サーモフィッシュャー社の Ion AmpliSeq cancer hotspot panel で解析を実施中であり、今年度中の結果公表を目指している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Omura G, Ando M, Ebihara Y, Saito Y, Kobayashi K, Fukuoka O, Akashi K, Yoshida M, Asakage T, Yamasoba T. The prognostic value of TP53 mutations in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2017 28;17(1):898doi:10.1186/s12885-017-3913-1. 査読あり

Saito Y, Omura G, Yasuhara K, Rikitake R, Akashi K, Fukuoka O, Yoshida M, Ando M, Asakage T, Yamasoba T. Prognostic value of lymphovascular invasion of the primary tumor in hypopharyngeal carcinoma after total laryngopharyngectomy. Head Neck. 2017;39(8):1535-1543.doi:10.1002/hed.24705. Epub 2017 Jun 5. 査読あり

Saito Y, Ushiku T, Omura G, Yasuhara K, Yoshida M, Takahashi W, Ando M, Fukayama M, Yamasoba T. Clinical Value of the Epstein-Barr Virus and p16 Status in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma: A

Single-Centre Study in Japan. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2016;78(6):334-343. doi:10.1159/000455901. Epub 2017 Feb 8. 査読あり

Omura G, Ando M, Saito Y, Fukuoka O, Akashi K, Yoshida M, Kakigi A, Asakage T, Yamasoba T. Survival impact of local extension sites in surgically treated patients with temporal bone squamous cell carcinoma. Int J Clin Oncol. 2017 Jun;22(3):431-437. doi: 10.1007/s10147-016-1076-8. Epub 2017 Jan 2. 査読あり

Omura G, Ando M, Saito Y, Kobayashi K, Yoshida M, Ebihara Y, Kanaya K, Fujimoto C, Sakamoto T, Kondo K, Asakage T, Yamasoba T. Association of the upregulated expression of focal adhesion kinase with poor prognosis and tumor dissemination in hypopharyngeal cancer. Head Neck. 2016 Aug;38(8):1164-9. doi: 10.1002/hed.24176. Epub 2016 Apr 9. 査読あり

[学会発表](計 5 件)

吉田昌史、他、可逆的な蛍光制御機構による FRET 型新規グルタチオン感受性蛍光プローブの開発と頭頸部癌への適用、日本耳鼻咽喉科学会、2016 年

齋藤 祐毅、他、p16 陽性中咽頭癌に対する導入化学療法の検討、日本頭頸部癌学会、2016 年

小村 豪、他、下咽頭癌手術例における TP53 変異の臨床病理学的検討、日本頭頸部癌学会、2016 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

朝蔭 孝宏 (ASAKAGE Takahiro)  
東京医科歯科大学・頭頸部外科・教授  
研究者番号：50361481

##### (2) 研究分担者

安藤 瑞生 (ANDO Mizuo)  
東京大学・耳鼻咽喉科・講師  
研究者番号：60511467

##### (3) 連携研究者

齊藤 祐毅 (SAITO Yuki)  
東京大学・耳鼻咽喉科・助教  
研究者番号：40611009

小村 豪 (OMURA Go)  
国立がん研究センター中央病院・頭頸部外  
科・医員  
研究者番号：00601139

##### (4) 研究協力者

( )